

論文内容の要旨

論文題目 骨髄移植用低侵襲造血幹細胞採取デバイスに関する研究

氏名 大橋 晃太

1. はじめに

白血病、悪性リンパ腫など造血器腫瘍の治療を目的として、同種骨髄移植が近年さかんに行われており、それに伴い、骨髄移植時のドナーからの骨髄採取は、今後ますます増加することが予想されている。また、骨髄細胞に含まれる造血幹細胞や間葉系幹細胞は、再生医療の幹細胞ソースとしても多くの注目を集めている。

ここで骨髄採取方法に目を向けると、今日主流である腸骨からの骨髄採取方法 (Aspiration Method) は、簡単な器具 (マルク針) で採取できる反面、ドナーへの合併症 (重篤な場合、心肺不全、脳血管の脂肪塞栓等) が問題となっている^{*1}。そこで、低侵襲骨髄採取法を提案し、それを実現するためのデバイスを開発する。試作機による評価実験を通じてその有用性を検討した。

2. 方法

Aspiration Method の解決すべき問題点は、①穿刺回数の多さ、②採取効率の悪さに大別される。広範囲の骨髄を採取するためには、多数回の穿刺を要する。また、採取した骨髄中に骨髄細胞は少なく、よって大量の骨髄採取が必要となり、数時間の全身麻酔下で長時間の手技が行われる。この 2 つの問題点を解消すべく、低侵襲造血幹細胞採取デバイスを考案していく。デバイス開発の参考とするため、骨髄の粘弾性を測定した結果、骨髄は降伏値が平均 1140Pa、ずり流動性を示す非ニュートン流体であることが確認された。従って、高いずり速度を発生させることで効率的に骨髄を採取できると考えられる。

2-1 骨穿孔軟性ドリルを用いた造血幹細胞採取マニピュレータ

既存手法の問題点を解決する方法として、骨穿孔軟性ドリルを用いた造血幹細胞採取マニピュレータを考案した^{*2}。穿刺回数を最小限に抑えるため、軟性のカテーテル状デバイスの先端にエンドミルを装備した“骨穿孔軟性ドリル”を用いて海綿骨に穿孔しながら骨髄を吸引していく。さらに、骨髄採取効率を高めるため、“造血幹細胞採取マニピュレータ”を用いて、アクチュエータにより機械的に強い陰圧を発生して骨髄を吸引する。手動による Aspiration Method に比べ高いずり速度を発生し、広範囲から効率的に骨髄を採取できると考えられる。

次に、この概念に基づいた試作機を製作した。骨穿孔軟性ドリル、造血幹細胞採取マニピ

ュレータ、パワーユニットから構成される。海綿骨は皮質骨に比べ脆いため、穿孔する骨穿孔軟性ドリルの先端は鈍なものとし、皮質骨に沿って受動的に屈曲しながら海綿骨を穿孔できるよう設計した。また造血幹細胞採取マニピュレータでは骨髓吸引のための陰圧と、ドリル先端の軸方向の振動を発生させる。

試作機の性能評価として、まず試作機を用いたブタ腸骨への海綿骨穿孔実験を行った。振動の穿孔における有用性（特に回転数 200rpm 以上）と、軟性ドリルによる皮質骨に沿った穿孔（全長 75.0~131mm）が確認された。また、屈曲特性を計測するため、骨モデル（Sawbones）を用いて海綿骨モデルから皮質骨モデルへ向けて角度を変化させながら穿孔した結果、入射角度 20° 以下、曲率半径 58mm 以上であれば受動的な屈曲が実現できることが明らかとなった。

次に、骨髓採取に関する評価として、実験動物（ブタ腸骨）を用いた試作機による骨髓採取実験を行った。腸骨稜からマルク針を用いて皮質骨を貫通後、骨穿孔軟性ドリルにより海綿骨を穿孔しながら、造血幹細胞採取マニピュレータを用いて骨髓を吸引採取していく。採取した骨髓の有核細胞数を計数し、濃度[cells/ μ l]、単位時間あたりに採取された細胞数[cells/min]、1回の穿刺あたりに採取された細胞数[cells/puncture]を Table I に示す。単位時間あたり 2 倍以上、1回の穿刺あたり 6 倍以上の細胞を確保された。これらの結果より、骨穿孔軟性ドリルを用いた造血幹細胞採取マニピュレータが、最小限の穿刺回数で高い効率で骨髓採取が可能であることが示唆された。

2-2 Perfusion Method を用いた骨髓灌流採取デバイス

Perfusion Method は、近年提案された低侵襲骨髓採取手法である³⁾。Aspiration Method と異なり、海綿骨の間隙に生理食塩水を灌流することでわずらひ力を発生させ広範囲から少ない穿刺回数で骨髓を採取することができる。しかし腸骨での Perfusion Method は、灌流時の流量と陽圧が過大である場合に脂肪塞栓症等の合併症が生じること、広範囲から灌流するには多点から灌流を協調して行う必要があることから、術者が行うのは困難である。そこで、これらの自動化を実現する装置を考案した。アクチュエータを用いて圧力・流量を制御し、数点からの灌流を協調して行うことで、腸骨に対する Perfusion Method の自動化を実現する。

概念設計に基づいて、試作機を製作した。試作機の機構としては、シリンジ（60ml）を直動機構で牽引し、陰圧を発生させるものである。目標の圧力値との差分をフィードバック制御していく。ブタ腸骨を用いた *in vitro* での骨髓灌流採取実験を行った。灌流された部分を染色しその面積を測定した結果、90 [mm] 間隔で 3 点間の灌流を行った場合、腸骨全体面積の平均 61% から灌流が可能であった ($n = 5$)。よって、最小限の穿刺による広範囲からの骨髓灌流採取への可能性が示された。また、灌流速度は毎分 15.2ml となり、池原らの Perfusion Method における報告を参考にすれば、移植可能な細胞数を約 30 分程度の灌流時間で採取可能である可能性が示唆された。実験動物を用いた骨髓採取実験において、移植に必要な有核細胞数を得ることを考えた場合、2 台のデバイスを協調して駆動することで、

既存の **Aspiration Method** では 41 回の穿刺を伴うところを 4 回の穿刺で、また 82 分の時間を要するところを約 39 分で採取可能であった。これらの結果から、本手法が既存手法に比して少ない穿刺回数で効率的な骨髄採取を実現できる可能性が示唆された。

2-3 考案したデバイスを併用した低侵襲骨髄採取システムとその有用性

骨穿孔軟性ドリルを用いた造血幹細胞採取マニピュレータを用いた動物実験結果から、移植に必要な有核細胞数を得るには、10 回以上の穿刺が必要であることが予想される。現状の手法に比して回数は減少するものの、さらなる効率化が求められる。

一方、**Perfusion Method** を用いた骨髄自動灌流採取デバイスは、腸骨稜にのみアプローチし灌流を行うため、ヒト腸骨の広範囲から骨髄をくまなく採取することは難しい。また、灌流には異方性があり、腸骨稜-腸骨稜間には灌流が生じにくい可能性が評価実験において示された。

そこで、両者を併用することで、この問題点を解決することが期待できる。つまり、骨穿孔軟性ドリルを用いて腸骨稜から腸骨内部に穿孔し、ルートを生成し、それと並行して腸骨稜から骨髄自動灌流採取デバイスを用いて骨髄を灌流採取していく。このような方法をとることによって、ヒト腸骨の広範囲から骨髄の採取が可能と考えられる。

このような骨髄採取システムが実現することで、将来的には再生医療や遺伝子治療など様々な細胞療法の幹細胞を採取するデバイスとして応用が期待される。ドナーや患者、死体などから本デバイスを用いて幹細胞を採取し、細胞療法的処置を行った後、患者の体内に戻すといったサイクルの一役を担うデバイスとしての利用が考えられる。

3. まとめ

低侵襲な骨髄採取を実現するデバイスとして、骨穿孔軟性ドリルを用いた造血幹細胞採取マニピュレータと、**Perfusion Method** を用いた骨髄灌流採取デバイスを提案し、*in vitro* でのブタ腸骨を用いた実験と、実験動物からの骨髄採取実験結果より、両者の有用性が確認された。今後、両者を組み合わせた、低侵襲造血幹細胞採取システムを構成することで、さらなる低侵襲化・効率化が期待できる。

今後、試作機の改良を行うと同時に、滅菌性・再利用性へのさらなる配慮や、採取された骨髄に対するコロニーアッセイ法などを用いた *viability* の評価を行っていく。

参考文献

- 1) C.D. Buckner et al.: "Marrow harvesting from normal donors," *Blood, Sep*; 64(3) (1984) pp.630-4
- 2) K. Ohashi et al.: "A Stem Cell Harvesting Manipulator with Flexible Drilling Unit for Bone Marrow Transplantation", *Proc. of MICCAI Vol.1* (2002) pp. 192-199
- 3) T. Kushida et.al. : "Comparison of Bone Marrow Cells Harvested from Various Bones of Cynomolgus Monkeys at Various Ages by Perfusion or Aspiration Methods: A Preclinical Study for Human BMT," *Stem Cells, Vol. 20, No.2* (2002) pp. 155-162